

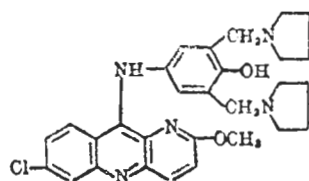
荧光分光法测定抗疟药咯萘啶¹

冯正、王翠英 (中国预防医学科学院寄生虫病研究所², 上海 200025)

提要 咯萘啶(PND)用正庚烷/异戊醇在 pH 10-11 提取, 再反萃取入酸水, 在 1.4 N NaOH 中置 60°C 水浴 15 min. 用同样溶剂提取, 于 394 和 458 nm 测得荧光强度与 PND 在 10-100 ng/ml 内成线性关系. 最低检出量为 10 ng/ml. 免全血、血浆、尿、肝匀浆及水溶液样品中的 PND 总回收率(±SD)为 100±4.0%. 此法专一性、精确度和重现性良好.

关键词 抗疟药; 咯萘啶; 荧光光谱测定法; 2-甲氧基-7-氯-10-[3',5'-双四氢吡咯次甲基-4'-羟基-苯基)氨基]苯并[b]1,5-萘啶

咯萘啶(pyronaridine, PND), 化学名 2-甲氧基-7-氯-10-[3',5'-双四氢吡咯次甲基-4'-羟基-苯基)氨基]苯并[b]1,5-萘啶, 是我所合成的一种高效红内期裂殖体杀灭剂^(1,2), 与



Pyronaridine

氯喹无交叉抗性. 临床应用证明对人间日疟和恶性疟有治愈作用⁽³⁻⁶⁾. 然而, 迄今尚无灵敏的测定方法. 为研究 PND 的药物动力学, 我们建立了测定生物样品及水溶液中 PND 的荧光分光法.

材料和方法

试剂 正庚烷经重蒸馏处理. 用全玻璃蒸馏仪制备重蒸水. Triton X 100 和 Amberlite

XAD-4 树脂分别购自 Roth 和 Mallinckrodt 公司. 硅胶 60 GF₂₅₄ 为 E. Merck 公司产品. 所有其他化学试剂和溶剂均为 AR 级. PND 磷酸盐纯品由本所药物化学研究室提供.

测定方法 1.0 ml 全血、血浆、尿或肝匀浆, 加重蒸水 1.0 ml 和 pH 11 缓冲液(0.1 M 碳酸钠/硼砂)3.5 ml. 混合后, 加 0.05 ml 的 2% Triton X 100 水溶液. 在测定水溶液样品时用 pH 10.5 缓冲液. 测定水及尿液样品, 不必加 Triton X 100. 用 5.0 ml 正庚烷/异戊醇(98/2, vol/vol)与上述溶液经振荡(200 次/分) 15 min 提取. 离心分离溶剂相, 吸取正庚烷/异戊醇(H/I)4.4 ml, 与 3.0 ml 0.1 N 盐酸振荡 15 min 反抽提, 离心后吸取上述盐酸溶液 2.5 ml, 加入 1.0 ml 的 5 N NaOH 溶液, 于 60°C 温育 15 min. 冷却, 加入 3.0 ml H/I 溶剂, 振荡 15 min, 离心分层后将 H/I 直接沿壁移入石英杯, 用日立 MPF-4 型荧光分光光度仪于 394 和 458 nm 测量荧光强度, 激发和发射光狭缝为 10 nm.

每次测定样品都同时制备标准曲线. 标准曲线至少含 4 个浓度点: 取 1 μg/ml 标准液 50, 100, 300, 500, 和 1000 μl, 以 0.1 N 盐酸溶液加至 2.5 ml, 然后加入 1 ml 的 5 N NaOH 溶液, 按上述测定步骤操作.

PND 浓度及剂量均以其碱基量表示.

样品处理 生物样品取自家兔和小白鼠. 全血用肝素抗凝. 尿液由代谢笼收集. 样品保存于 -20°C 直至测定.

为检验测定方法的专一性, 用薄层层析法(TLC)分离给药小鼠尿的提取物, 并和 PND 标准比较. 小鼠 ig PND 250 mg/kg, 混合 4 鼠的 24 h 尿液, 于 20-25°C 减压浓缩 8 倍. 取此浓

1985年3月16日收稿 1985年9月18日修回

¹ 本项研究得到联合国开发计划署/世界银行/世界卫生组织热带病研究培训特别规划的部分支持

² 世界卫生组织疟疾、血吸虫病、丝虫病合作中心

缩尿 2 ml, 按测定方法提取, 提取液经旋转减压蒸干, 用 50% 乙醇 250 μ l 溶解残渣(C), 作 TLC 分析。对照鼠尿经同样处理(D)。另取 10 ml 未经浓缩的同样尿液, 通过 Amberlite XAD-4 树脂柱(1 \times 10 cm), 用 2 倍柱床体积的水洗柱后, 再用丙酮洗脱。洗脱液经减压蒸干, 残渣溶于 200 μ l 50% 乙醇, 作 TLC 分析。

TLC 分析 样品在硅胶 60 GF₂₅₄ 薄板(0.25 mm)上展开, 溶剂系统为正丁醇/95% 乙醇/稀氨水(12/25/10, vol/vol/vol)。稀氨水由 21 ml 25-28% 氨水加水至 52 ml 配制, 展开后在 uv 光下观察结果。

给药兔全血 PND 浓度的测定 ig PND 30 mg/kg 的兔, 由心脏穿刺定时取血, 按上述方法测定全血中的 PND 浓度。

结果和讨论

PND 的荧光 PND 的水或 0.1 N HCl 溶液无荧光, 在 pH 10.5 水溶液中用 H/I 提取的提取液也无荧光, 但在 1.0 N NaOH 中, 或在 1.4 N NaOH 溶液中用 H/I 提取的提取液具有弱荧光。如果 PND 的 1.4 N NaOH 溶液先经 60 $^{\circ}$ C 加热 15 min, 再用 H/I 提取, 则提取物的荧光强度比不加热处理者提高一倍。该荧光的激发和发射峰分别为 394 和 458 nm(图 1)。荧光强度在 2 h 内保持稳定(表 1)。

Tab 1. Fluorescence-time course of pyronaridine in *n*-heptane/isoamyl alcohol (98/2, v/v) extracted from 1.4 N NaOH heated at 60 $^{\circ}$ C for 15 min. $n=3$. $\bar{x} \pm SD$

Time (min)	Fluorescence intensity of PND	
	100 ng	200 ng
0	41.2 \pm 0.8	82.8 \pm 4.1
15	42.1 \pm 1.0	83.8 \pm 5.3
30	42.1 \pm 1.1	83.7 \pm 4.8
60	42.5 \pm 1.0	82.6 \pm 4.6
120	41.9 \pm 1.1	83.2 \pm 4.5
210	36.9 \pm 0.9	81.3 \pm 4.0
300	36.0 \pm 0.7	81.2 \pm 4.3

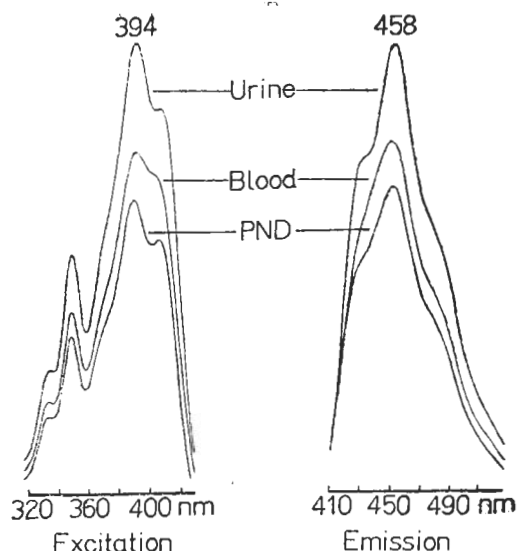


Fig 1. Fluorescence spectra of PND standard and the extract from whole blood and urine of dosed rabbit.

加热处理的条件以 60 $^{\circ}$ C, 15 min 为佳。再提高温度或延长并不明显增强荧光。

上述荧光强度与 PND 浓度在 10-1000 ng/ml 范围内成线性关系。17 次连续不同天、不同批制备的标准曲线, 回归系数为 0.9997 ± 0.00027 , 斜率为 $1.238 \pm 0.056(20^{\circ}\text{C})$ 。

方法学检验

1. 定量回收 加入已知量 PND 的兔全血、血浆、尿、肝匀浆、或水, 按上述方法测定, 总回收率为 $100 \pm 4\%$ (表 2)。

2. 方法的专一性 PND 和给药后兔全血、尿液中的提取物具有相同的荧光谱(图 1)。对照血、尿的提取物显示很低的空白值, 几与试剂空白重叠。

TLC 分析结果, 在 uv 下 PND(A) 于薄板的浅绿色荧光背景上呈一暗斑($R_F = 0.75 \pm 0.03$)。给药鼠尿中的提取物(C)呈现一亮绿色荧光斑, 其 R_F 值与 PND 的相一致。未给药鼠尿的提取物(D), 无任何荧光斑或暗斑。将提取物(C)和 PND(A)混合, 点样分析, 展开后得到一个暗斑和荧光斑的重叠斑(图 2)。在同样的 TLC 分析条件下, 未经提取的给药尿有 8 个暗斑。

Tab 2. Pyronaridine recovery from rabbit blood, plasma, urine, liver homogenate and water solution. 3 assays $\bar{x} \pm SD$

	Added (ng)	Found (ng)	Recovery %
Whole blood	25	24.9 ± 0.4	99.5 ± 1.4
	50	51.9 ± 1.7	103.5 ± 3.4
	300	290.2 ± 10.5	96.7 ± 3.5
	1000	1026 ± 17	102.6 ± 1.7
Plasma	25	24.9 ± 1.2	99.4 ± 5.1
	50	50.7 ± 1.9	101.5 ± 3.9
	300	285.2 ± 8.2	95.1 ± 2.7
	1000	998 ± 26	99.8 ± 2.6
Liver homogenate	100	101.1 ± 3.3	101.1 ± 3.3
	300	314.6 ± 4.0	104.9 ± 1.3
Urine	100	101.3 ± 2.5	101.3 ± 2.5
	300	297 ± 21	98.9 ± 7.0
Water	25	24.9 ± 1.3	99.5 ± 5.1
	100	96.9 ± 2.2	96.9 ± 2.2
	Overall		100 ± 4

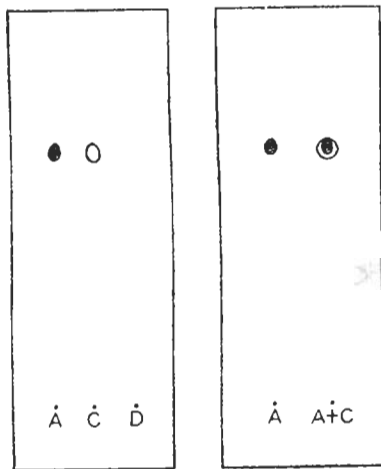


Fig 2. TLC analysis of PND standard (A) and the extract from dosed mouse urine (C) and control urine (D) (silica gel 60 GF₂₅₄ plate viewed under uv light, the shaded circle stands for the dark spot, and the blank circle for the bright green fluorescent spot).

荧光谱和 TLC 分析的结果表明, 本测定方法具有检测 PND 原药的专一性。

3. 灵敏度 方法的灵敏度以与零读数有显著差别的 PND 浓度作为最低检出量表示。根

据 17 次不同天、不同批连续测定结果的分析, 最低检出量为 10 ng/ml ($p < 0.05$)。

4. 精确度 方法的精确度按 $SD = (\Sigma d^2 / 2N)^{1/2}$ 公式⁽⁷⁾计算, d 为重复管测定差值, N 为重复管测定的次数, 经检验, 35 次连续测定给药后兔血样(PND 浓度范围 12-788 ng/ml)的 $SD = 10.9$ ng/ml, 变异系数(CV)为 4.7%。

5. 重现性 连续 7 次测定 2 个给药兔全血样品的 PND 浓度(每次 4 个重复管), 检出值分别为 183 ± 4 和 345 ± 12 ng/ml, CV 分别为 2.0 和 3.4%。

6. 给药兔全血 PND 浓度的测定 给 PND 30 mg/kg 后的兔全血药物浓度, 可追踪至 d 13(图 3)。

结果表明本法是一种灵敏度、专一性、精确度和可重现性高的 PND 检测方法。

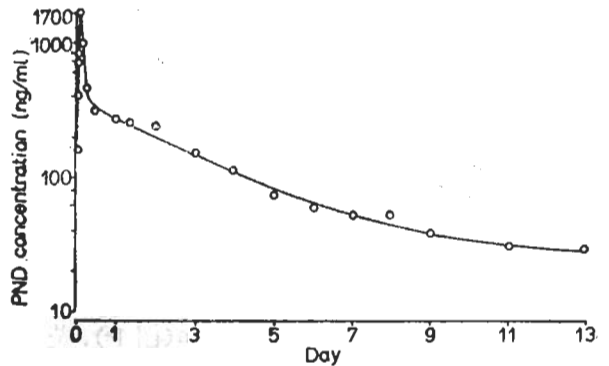


Fig 3. Rabbit whole blood PND concentrations after intragastric gavage 30 mg/kg.

参 考 文 献

- 1 中国医学科学院寄生虫研究所原疟疾研究室 新药组. 抗疟新药的疗效和毒性的实验研究. 药学学报 1980; 15: 630
- 2 郑贤育、陈 昌、高芳华、朱佩萼、郭惠珠. 抗疟新药咯茶啉及其类似物的合成. 药学学报 1982; 17: 118
- 3 Lapierre, J. Paludisme à *Plasmodium falciparum*, polychimiotésistant, traité avec succès par la benzonaphthiridine. *Nouv Presse Méd* 1982; 11: 673
- 4 许永湘、王元昌、刘德全、孙金琳、顾政诚、郑贤育、郭惠珠. 磷酸咯茶啉静脉滴注治疗疟疾的临床观察. 中华内科杂志 1982; 21: 655

5 张家坝、许永湘、龙伯英、梅英石。三例危重脑型恶性疟的救治。寄生虫学与寄生虫病杂志 1983; 1 : 59

6 车立刚、黄开国、杨恒林。抗氯喹恶性疟原虫株对咯萘啶敏感性的测定。同上 1984; 2 : 280
7 Snedecor GW. *Queries. Biometrics* 1952; 8 : 85

Acta Pharmacologica Sinica 1986 Jul, 7 (4) : 354-357

Spectrofluorometric determination of pyronaridine, an antimalarial

FENG Zheng, WANG Cui-ying

(*Inst Parasitic Diseases¹, Chinese Academy of Preventive Medicine¹, Shanghai 200025*)

ABSTRACT A spectrofluorometric method for determination of pyronaridine (2-methoxy-7-chloro-10-[3',5'-bis(pyrrolidinyl-1-methyl)-hydroxy-anilino]benzo[b]-1,5-naphthyridine tetraphosphate; PND) was established in biological samples and water solution. PND in the samples was extracted with *n*-heptane/isoamyl alcohol (98/2, vol/vol) at pH 10-11. After back-extraction into 0.1 N HCl, the HCl solution was alkalinized to a final concentration of 1.4 N NaOH, and then placed in a bath of 60°C for 15 min. The fluorescence of the extract with *n*-heptane/isoamyl alcohol from the heated NaOH solution was measured at 394 and 458 nm. The fluorescence was linear with PND concentrations over the range of 10-1000 ng/ml. The overall recovery from rabbit whole blood, plasma, urine, liver homogenate, and water solution was 100±4% with a detectable limit of 10 ng/ml. The fluorescent spectra and TLC analysis showed that the method was

specific for determination of unchanged PND in the biological samples. The assay was precise as indicated by a SD being 10.9 ng/ml, and coefficient of variation 4.7% estimated from 35 determinations. The reproducibility was assessed by 7 successive runs for 2 blood samples, and the values obtained were 183 ± 4 ng/ml with a coefficient of variation 2.0%, and 345 ± 12 ng/ml, 3.4%. Rabbit blood concentration after ig 30 mg/kg was followed up to d 13 using this method.

KEY WORDS antimalarials; pyronaridine; 2-methoxy-7-chloro-10-[3',5'-bis(pyrrolidinyl-1-methyl)-hydroxy-anilino]benzo[b]-1,5-naphthyridine (pyronaridine); fluorescence spectrometry

¹ WHO Collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis; Partial financial support was received from UNDP/World Bank/WHO TDR